

(57) 要約

脂質に結合した脂肪酸の $\Delta 9$ 位を不飽和化する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子；当該遺伝子又は当該遺伝子の一部を含むポリヌクレオチドを含むベクター；脂質に結合した脂肪酸の $\Delta 9$ 位を不飽和化する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子又は当該遺伝子の一部を含むポリヌクレオチドが導入された植物細胞；前記植物細胞を分化させて植物体を再生させることを特徴とする植物の作出方法；および、脂質に結合した脂肪酸の $\Delta 9$ 位を不飽和化する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子又は当該遺伝子の一部を含むポリヌクレオチドが導入された植物。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AM	アルメニア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RU	ロシア連邦
AT	オーストリア	ES	スペイン	LR	リベリア	RS	セルビア
AU	オーストラリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
BB	バルバドス	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
BG	ブルガリア	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	SI	スロベニア
BJ	ベナン	GG	ガイアナ	MC	モナコ	SK	スロバキア共和国
BR	ブラジル	GN	ギニア	MD	モルドバ	SS	スウェーデン
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	ML	マリ	SN	セネガル
CA	カナダ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TD	チャド
CF	中央アフリカ共和国	IE	アイルランド	MR	モロッコ	TG	トーゴ
CG	コンゴ	IS	アイスランド	MW	マラウイ	TM	トルクメニスタン
CH	スイス	IT	イタリア	MX	メキシコ	TT	トリニダード・トバゴ
CI	コート・ジボワール	JP	日本	NE	ニジェール	UA	ウクライナ
CM	カメルーン	KE	ケニア	NL	オランダ	UG	ウガンダ
CN	中国	KG	キルギスタン	NO	ノルウェー	US	米国
CZ	チェコ共和国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NZ	ニュージーランド	UZ	ウズベキスタン共和国
DE	ドイツ	KR	大韓民国	PL	ポーランド	VN	ベトナム
DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	PT	ポルトガル		
		LI	リヒテンシュタイン	RO	ルーマニア		

明 細 書

脂肪酸の不飽和化酵素遺伝子、当該遺伝子を含むベクター、当該遺伝子が導入された植物及びその作出方法

技術分野

本発明は、脂質に結合した脂肪酸の $\Delta 9$ 位を不飽和化する活性を有するタンパク質（以下、 $\Delta 9$ 位不飽和化酵素という）をコードする遺伝子、当該遺伝子を含むベクター、当該遺伝子が導入された植物およびその作出方法に関するものである。

背景技術

生物の生体膜を構成する脂質である膜脂質は外界温度の低下に伴って、液晶状態から固体状態へと変化（相分離）する。そして、かかる相分離に伴い生体膜の性質が変化する。すなわち、膜脂質が固体状態では物質透過の選択性がなくなるため、生体膜が本来の機能を果たせなくなり、その結果細胞に傷害（低温傷害）が生ずると考えられている。

液晶状態から固体状態あるいはその逆に変化する温度である膜脂質の相転移温度は、主に脂質に結合している脂肪酸アシル基の不飽和度（炭素鎖中の二重結合の数）によって決定付けられる。すなわち、結合している脂肪酸アシル基が二つとも飽和脂肪酸である場合、この脂質分子種の相転移温度は室温よりも高いが、結合した脂肪酸アシル基に二重結合を少なくとも1個持つような脂質分子種の相転移温度は、ほぼ 0°C 以下である。（Santaren, J.F. et al., Biochim. Biophys. Acta, 687:231, 1982）。

なお、一般に脂肪酸の二重結合の位置は、そのカルボキシル基末端から二重結合のある炭素までの炭素数を Δ （デルタ）に続いて示す。また、二重結合の総数は全炭素数の後にコロンに続いて記載する。例えば、リノール酸は $18:2\Delta 9, 12$ と記述され、その構造は

$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
である。また、二重結合の位置を ω （オメガ）に続いて記載する場合があるが、

これは脂肪酸のメチル基末端から二重結合のある炭素までの炭素数を示している。

高等植物の膜脂質の中で、飽和分子種が比較的多いのはホスファチジルグリセロール (PG) のみであり、植物の低温傷害の起因がPGの相転移によること (Murata, N. et al., *Plant Cell Physiol.*, 23:1071, 1982; Roughan, P. G., *Plant Physiol.*, 77:740, 1985)、またPGの分子種組成が葉緑体に存在するグリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ (以下ATase) の基質選択性によって決められていること (Frentzen, M. et al., *Eur. J. Biochem.*, 129:629, 1983; Murata, N., *Plant Cell Physiol.*, 24:81, 1983; Frentzen, M. et al., *Plant Cell Physiol.*, 28:1195, 1988) が強く示唆されていた。

これらの仮定に基づき西澤らは、低温に強い植物のシロイヌナズナから取得したATase遺伝子をタバコに導入・発現することによりPGの飽和分子種含量を下げ、タバコを野生株よりも低温に対して強くすることができることを示した (PCT特許出願: PCT/JP92/00024, 1992)。しかし、ATaseは元の植物中にも存在し、かりに外来のATaseを植物中で大量発現させたとしても、内在性のATaseと競合しあうことは避けられず、外来のATaseの効果が希釈される可能性は否めない。例えば、作成した形質転換タバコのうちシロイヌナズナのATaseを最も大量に発現しているクローンの葉のPGの飽和分子種含量は約28%でありタバコ野生株よりも約8%少ないが、シロイヌナズナ野生株よりも約8%多かった (PCT特許出願: PCT/JP92/00024, 1992)。

さらに、一般にプラスチドで作られるアシル-ACP は主に16:0-ACPと18:1-ACPであり、またそれらの割合はほぼ等量であると考えられているが、組織によっては16:0-ACPや18:0-ACPの割合が18:1-ACPより高いことも考えられる (Toriyama, S. et al., *Plant Cell Physiol.*, 29:615, 1988)。このような組織では外来のATaseによって飽和分子種含量を十分に減少させることが困難であるとも考えられる。

ところで、光合成細菌のシアノバクテリア (ラン藻) の膜脂質の組成は、高等植物の葉緑体を構成している膜系の脂質組成と類似している (Murata, N. et al., in "The Biochemistry of Plants", Academic Press, 1987)。またラン藻では、膜脂質に結合した脂肪酸の不飽和度は、脂質に結合した脂肪酸を不飽和化する酵素によって制御されている。そして、脂質に結合した脂肪酸に二重結合を1つし

か入れられない *Anacystis nidulans* (別名 *Synechococcus* PCC 7942) は低温感受性であるが (Ono, T. et al., *Plant Physiol.*, 67:176, 1981)、2 つ以上入れられる *Synechocystis* PCC6803 は低温耐性であることが知られていた (Wada, H. et al., *Plant Cell Physiol.*, 30:971, 1989)。

また、ラン藻における脂肪酸の不飽和化酵素は、すべて脂質を基質とし、脂質に結合した脂肪酸に二重結合を導入する。従って、ラン藻は 16:0/16:0- および 18:0/16:0- の飽和分子種からなる膜脂質の PG、SQDG、MGDG および DGDG の脂肪酸に cis-型の二重結合を導入することが可能である (Murata, N. et al., in "The Biochemistry of Plants", Academic Press, 1987)。かかる点は脂肪酸不飽和化酵素として、ステアロイル-ACP (18:0-ACP) の $\Delta 9$ 位に二重結合を導入する酵素を有し、一旦 16:0/16:0- (および、わずかに存在する 18:0/16:0-) の飽和分子種からなる PG および SQDG が合成されると、それらの脂肪酸に決して cis-型の二重結合を導入しない高等植物と大きく異なる点である。

現在、*Synechocystis* PCC6803 の $\Delta 12$ 位不飽和化酵素遺伝子を *Anacystis nidulans* に導入・発現させることにより本来 *Anacystis nidulans* には存在しない 16:2 $\Delta 9, 12$ および 18:2 $\Delta 9, 12$ を生産させることが可能であり、結果として本来低温感受性である *Anacystis nidulans* を低温耐性へと転換可能であることが示されている (Wada, H. et al., *Nature*, 347:200, 1990)。

なお、これまでにラン藻の不飽和化酵素のうち $\Delta 6$ 位 (Reddy, A. S. et al., *Plant Mol. Biol.*, 27:293, 1993) および $\Delta 12$ 位 (Wada, H. et al., *Nature*, 347:200, 1990) 不飽和化酵素の遺伝子が取得されている。しかし、 $\Delta 9$ 位に二重結合が導入されていなければ、 $\Delta 6$ 位および $\Delta 12$ 位不飽和化酵素は、それぞれ $\Delta 6$ 位と $\Delta 12$ 位を不飽和化することはできない。また、 $\Delta 9$ 位と $\Delta 12$ 位がともに不飽和化されていなければ $\Delta 15$ 位不飽和化酵素は $\Delta 15$ 位を不飽和化することはできない。従って、脂肪酸の $\Delta 9$ 位を不飽和化する酵素の遺伝子を高等植物に導入し発現させれば、高等植物における飽和分子種含量を低下させ、その結果として該高等植物を低温耐性にすることができるはずである。しかしながら、現在まで、脂肪酸の $\Delta 9$ 位を不飽和化する酵素の遺伝子は得られていなかった。

従って、本発明は、脂肪酸の $\Delta 9$ 位を不飽和化する酵素の遺伝子およびその一

部を含むポリヌクレオチドを提供することを目的とする。

また、本発明は、脂肪酸の $\Delta 9$ 位を不飽和化する酵素の遺伝子またはその一部を含むポリヌクレオチドを含むベクターを提供することも目的とする。

さらに、本発明は、脂肪酸の $\Delta 9$ 位を不飽和化する酵素の遺伝子またはその一部を含むポリヌクレオチドが導入された植物細胞および植物を提供することも目的とする。

発明の開示

上記目的を達成するため、本発明者は、*Anacystis* 属に属するラン藻のゲノム DNA から $\Delta 9$ 位不飽和化酵素をコードする遺伝子をクローニングし、該遺伝子を組み込んだベクター DNA を得た後、該ベクター DNA で植物細胞を形質転換し、これを分化させて植物体を再生させることにより、植物に低温耐性を付与することに成功し、本発明を完成させるに至った。すなわち、本発明は、以下の事項を要旨とするものである。

- (1) 脂質に結合した脂肪酸の $\Delta 9$ 位を不飽和化する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子。
- (2) 脂質に結合した脂肪酸の $\Delta 9$ 位を不飽和化する活性を有するタンパク質が実質的に配列番号 4 に記載されたアミノ酸配列を有するものである(1)に記載の遺伝子又は当該遺伝子の一部を含むポリヌクレオチド。
- (3) 脂質に結合した脂肪酸の $\Delta 9$ 位を不飽和化する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子が配列番号 3 に記載の塩基配列を含む DNA 鎖である(1)に記載の遺伝子又は当該遺伝子の一部を含むポリヌクレオチド。
- (4) (1)乃至(3)のいずれかに記載の遺伝子又は当該遺伝子の一部を含むポリヌクレオチドを含むベクター。
- (5) (1)乃至(3)のいずれかに記載の遺伝子又は当該遺伝子の一部を含むポリヌクレオチドが導入された植物細胞。
- (6) (5)に記載の植物細胞を分化させて植物体を再生させることを特徴とする植物の作出方法。
- (7) (1)乃至(3)のいずれかに記載の遺伝子又は当該遺伝子の一部を含むポリヌクレ

オチドが導入された植物。

図面の簡単な説明

第1図は、des 9 var 断片がコードするアミノ酸配列とマウスのステアロイル-C o A不飽和化酵素(MSCD2)のアミノ酸配列の比較を示す。図中で両者が同一のアミノ酸の場合は:、性質が類似したアミノ酸の場合は・を付け比較した。Xは、その間での相同性が高い範囲を示す。

第2図は、des 9 var 断片をプローブとして、*Anacystis nidulans* のゲノムDNAをサザン分析したオートラジオグラムを示す電気泳動写真である。

第3図は、 λ 5、 λ 15およびp15XのインサートDNA断片の相互関係を示す。太い矢印はタンパク質をコードしている部分と方向を、細い矢印はシーケンスを決定した部位とその方向を示す。

第4図は、des 9 nidとマウスのステアロイル-C o A不飽和化酵素(MSCD2)のアミノ酸配列の比較を示す。アミノ酸配列の比較は第1図と同様にして行った。

第5図は、植物体レベルでの形質転換タバコに対する低温処理の影響を示す生物の形態の写真である。左は不飽和化酵素遺伝子を導入したタバコを低温処理した結果を、右は対照としてpBI121を導入したタバコを低温処理した結果を示す。

発明の実施するための最良の形態

本発明にいう、 Δ 9 位不飽和化酵素は、上記「従来の技術」等に記載したごとく本来ラン藻に存在する酵素である。 Δ 9 位不飽和化酵素の化学構造は、マウス(Kaestner, K. H. et al., J. Biol. Chem., 264:14755, 1989)、ラット(Mihara, K., J. Biochem., 108:1022, 1990) 及び酵母(Stukey, J. E. et al., J. Biol. Chem., 265:20144, 1990) のステアロイル-C o A不飽和化酵素の化学構造と局所的に類似しているが全体的には大きく異なる。また既知のラン藻の脂質に結合した脂肪酸の Δ 6 位および Δ 12位の不飽和化酵素及び高等植物の脂質に結合した脂肪酸の ω 3 位の不飽和化酵素(Yadav, N. S. et al., Plant Physiol., 103:467, 1993) の化学構造とは全く類似していない。本発明遺伝子を

天然素材から製造する場合は、ラン藻を原材料として使用するとよい。ここで用いられるラン藻は特に限定されず、例えばAnacystis属、Synechocystis属、Anabaena属等に属するラン藻を挙げることができる。なお、以下の理由により、高等植物の飽和分子種を不飽和化するためにはAnacystis型 (Murata, N. et al., Plant Cell Physiol., 33: 933, 1992。この文献で言うグループ1型のラン藻) の $\Delta 9$ 位不飽和化酵素の方がAnabaena型及びSynechocystis型の酵素よりも好ましい。

すなわち、Synechocystis PCC6803 とAnabaena variabilisでは、その膜脂質のほとんどがsn-1とsn-2にそれぞれ炭素数18の脂肪酸 (C18) と炭素数16の脂肪酸 (C16) を結合している (Sato, N. et al., Biochim. Biophys. Acta, 710: 279, 1982; Wada, H. et al., Plant Cell Physiol., 30:971, 1989) のに対して、Anacystis nidulansではほとんどがsn-1とsn-2ともにC16を結合している (Bishop, D. G. et al., Plant Cell Physiol., 27:1593, 1986)。従って、AnabaenaとSynechocystisの $\Delta 9$ 位不飽和化酵素は主に18:0/16:0-の分子種を基質としてsn-1の18:0を18:1 $\Delta 9$ に不飽和化する活性を有すると思われる。これに対してAnacystisの $\Delta 9$ 位不飽和化酵素は主に16:0/16:0-の分子種を基質としてsn-1の16:0を16:1 $\Delta 9$ に不飽和化する活性を有すると思われる。さらに、高等植物に多く見られる飽和分子種が16:0/16:0-であることから、高等植物の飽和分子種を不飽和化するためにはAnacystis型の $\Delta 9$ 位不飽和化酵素のほうがAnabaenaおよびSynechocystis型の酵素より適切である。

本発明遺伝子は後述する実施例に示すように、実質的に配列番号4に記載されたアミノ酸配列を有する $\Delta 9$ 位不飽和化酵素をコードするものを含み、縮重コードンにおいてのみ異なっていて同一のポリペプチドをコードすることのできる縮重異性体を含むものである。本発明遺伝子は、主にDNA鎖としての具体的形態を有する。なお、「実質的に配列番号4に記載されたアミノ酸配列」とは、配列番号4に記載されたアミノ酸配列に加えて、 $\Delta 9$ 位不飽和化酵素活性を有するかぎり、配列番号4に記載されたアミノ酸配列の一部に欠失、置換、付加などがあってもよいアミノ酸配列を含むものである。

本発明遺伝子は、上記ラン藻細胞から通常公知の手法を用いて製造することが

できる。

すなわち、ラン藻細胞を培養して集積し、当該ラン藻細胞からエタノール沈澱法等の通常公知の手法によりゲノムDNAを調製し、当該ゲノムDNAを基にした遺伝子ライブラリーを調製し、当該ライブラリーより所望の遺伝子を含むクローンを選抜し、これを増幅することで製造することが可能である。

ここで用いる遺伝子ライブラリー作成用ベクターとしては、当該ベクターとして通常用いられるものを挙げるができる。具体的には、 λ DASH II (Stratagene)等のファージ；pWB15 (Stratagene)等のコスミド；pBluescript II (Stratagene)等のファージミド等を挙げることができる。上記ベクターへの具体的な遺伝子導入方法は、それぞれのベクターに応じた通常公知の方法を用いることができる。

このようにして調製した遺伝子ライブラリーから本発明遺伝子が導入されたクローンを選抜する。

当該選抜方法としては通常公知の選抜方法、例えば抗体によるブランクハイブリダイゼーション法若しくはコロニーハイブリダイゼーション法等の免疫学的方法又はヌクレオチドプローブによるブランクハイブリダイゼーション法若しくはコロニーハイブリダイゼーション法等を用いることができる。なお、上記ヌクレオチドプローブの選択基準として、本発明遺伝子に類似すると推測される塩基配列の一部（例えば、第1図のMSCD2のアミノ酸配列番号260から295の一部を塩基配列に読みかえたもの）をプローブとして用いるのが好ましい。

このようにして選抜したクローンにおける本発明遺伝子の塩基配列の決定及び確認は、通常公知の方法を用いて行うことができる。例えば、マキシムーギルバート法 (Maxam-Gilbert, Methods Enzymol., 65:499, 1980) やM13 ファージを用いるジデオキシヌクレオチド鎖終結法 (Messing, J. et al., Gene, 19:269, 1982) 等により行うことができる。

なお、 Δ 9 位不飽和化酵素が実際に発現しているか否かの確認は例えば、和田らの方法 (J. Bacteriol., 175:6056, 1993) に従って行うことができる。

上記のようにして塩基配列が決定された本発明遺伝子は、通常公知の手段、例えばホスファイト法を用いた市販のDNAシンセサイザーで合成することも可能

である。

本発明遺伝子又は本発明遺伝子の一部を含み $\Delta 9$ 位不飽和化活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを上記クローンから分離し、これを植物体への遺伝子導入用ベクターに組み込み、このベクターを植物細胞へ導入し、 $\Delta 9$ 位不飽和化酵素を植物体中で発現させることにより、所望の植物に低温耐性を付与することができる。

なお、上記の遺伝子導入が可能な植物の種類には特に制限はない。

ここでいう遺伝子導入用ベクターは、 $\Delta 9$ 位不飽和化酵素遺伝子が植物体中で安定に発現しうるように構成されることが必要である。具体的には、プロモーター、翻訳調節領域をコードするDNA鎖、葉緑体への転移ペプチドをコードするDNA鎖、本発明遺伝子又は本発明遺伝子の一部を含み $\Delta 9$ 位不飽和化活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、翻訳終止コドンにコードするDNA鎖及びターミネーターが適切な位置関係で組み込まれていることが必要である。なお、本発明遺伝子以外の遺伝子導入用ベクターの構成要素としては通常公知のものを用いることができる。上記葉緑体への転移ペプチドをコードするDNA鎖としては、例えばエンドウのリブローズ-1, 5-二リン酸カルボキシラーゼの小サブユニット遺伝子を当該転移ペプチドをコードするDNA鎖として好適に用いることができる。プロモーターとしては、例えばカリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーターを、またターミネーターとしては、例えばノパリン合成酵素のターミネーターを用いることができる。

植物細胞への遺伝子導入方法としては、通常公知の方法、例えば「*Plant genetic transformation and gene expression; a laboratory manual*”, Draper, J. et al. eds., Blackwell Scientific Publications, 1988」記載の方法を用いて行うことができる。その例としては、生物的方法であるウィルスを用いる方法、アグロバクテリウムを用いる方法など、物理・化学的方法であるエレクトロポレーション法、ポリエチレングリコール法、マイクロインジェクションなどが挙げられる。これらのうち、タバコを初めとする双子葉植物に対しては、安定な形質転換を確実にできる点から、アグロバクテリウムを用いる方法が好ましい。アグロバクテリウムを用いる方法には、野生型腫瘍プラスミドを用いる中間ベクター

法(Nature, 287 (1980), p. 654; Cell, 32 (1983) p. 1033; EMBO J., 3 (1984) P. 1525)、T-DNA上の腫瘍形成遺伝子領域を欠損させたベクターを利用する中間ベクター法(EMBO J., 2 (1983) P. 2143; Bio/Technology, 3 (1985) p. 629)、バイナリーベクター法(Bio/Technology, 1 (1983) p. 262; Nature, 303 (1983) p. 179; Nucl. Acids Res., 12 (1984) p. 8711)などがあり、これらのいずれの方法を用いてもよい。アグロバクテリウムを植物に感染させる方法としては、培養細胞への直接接種法、プロトプラスト共存培養法、リーフディスク法等が挙げられるが、直接かつ容易に多数の形質転換植物体を作成することができるという点から、リーフディスク法を使用することが好ましい。

さらに、植物体を再分化させるには、MS-HF培地等の公知の培地に選択用の抗生物質や植物生長ホルモン等を添加した培地で培養すればよい。発根した幼植物体を土壌に移植して栽培すれば、完全な植物体にまで成長させることができる。

完全な植物体にまで成長させた形質転換植物が低温耐性を有しているか否かについては、以下のようにして検討することができる。

低温傷害を受けない温度(例えば25℃)で検定植物を栽培した後、一時的に(例えば一週間)低温下(例えば4℃)で栽培し、植物への傷害、例えば葉のクロロシスや稔性の低下を測定すること、あるいは、低温下での生長量を対照植物と比較することにより検討できる。

以下実施例をあげて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

〔実施例1〕*Anabaena variabilis*の $\Delta 12$ 位不飽和化酵素遺伝子(*desA*)の上流に隣接してあるオープンリーディングフレームのDNA断片のクローニング

Anabaena variabilis IAM M-3 (東京大学分子細胞生物学研究所より譲)を、約100mlのBG-11培地("Plant Molecular Biology", Shaw, C. H. ed., p. 279, IRL PRESS, 1988)で培養した。25℃、1,000luxの蛍光灯下で毎分120回転とし、充分菌を生育させた。培養液を室温で5,000gで10分間遠心分離することにより菌体を沈殿物として回収した。

ゲノムDNAを調製するため、菌体を50mlのA液(50mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0)に懸濁して洗浄し、遠心分離することにより菌体を沈殿物として回収した。次に、15mlのB液(50mM Tris-HCl, 20mM EDTA, 50mM NaCl, 0.25 M sucrose, pH8.0)に懸濁し、B液で溶解した40mgのリゾチーム(Sigma)を加え37°Cで1時間振とうした。次にプロテナーゼKを15mgとSDSを終濃度で1%になるように加え37°Cで1晩振とうした。その後、NaClO₄を終濃度で1Mになるように加え、さらに20mlのクロロホルム/イソアミルアルコール(24:1)を加えて10分間振とうした後、遠心分離により水層を回収した。クロロホルム/イソアミルアルコール(24:1)により再抽出した後、水層に50mlのエタノールを加え、ゲノムDNA調製物をガラス棒に巻き付けて回収した。このDNA調製物を20mlのA液に溶かし、NaClを終濃度で0.1Mにし、さらにRNaseを終濃度で50mg/mlになるように加え、37°Cで1時間インキュベートした。次に、A液で飽和した等量のフェノールで2回抽出した後、水層中のゲノムDNAをエタノールを加えることにより沈殿物として回収し、70%エタノールで洗浄後、1mlのA液に溶かし*Anabaena variabilis*のゲノムDNA溶液とした。

坂本らは*Anabaena variabilis*由来の膜脂質に結合した脂肪酸の $\Delta 12$ 位不飽和化酵素遺伝子のクローニングについて発表(1993年日本植物生理学会年会、講演要旨集、No. 3aF04)した際、 $\Delta 12$ 位不飽和化酵素遺伝子上流に隣接してオープンリーディングフレーム(ORF)が存在し、これが不飽和化酵素と何らかの関係を有する可能性を報告したが、その機能は同定されていなかった。本発明者らはそのORFおよび機能に関心をもち、そのORFのDNA鎖中の3箇所の塩基配列に着目して、4本のプライマー(配列番号5～配列番号8)を合成し、*Anabaena variabilis*のゲノムDNAを鋳型としてPCRを行なった。

上記4本のプライマーのうち、配列番号5と6に示された塩基配列を有するプライマーがセンス鎖、配列番号7と8に示された塩基配列を有するプライマーがアンチセンス鎖をコードし、配列番号6と7に示された塩基配列は同一のアミノ酸配列に由来している。センス鎖およびアンチセンス鎖からそれぞれ任意に1種類ずつのプライマーを選び、計4種類のプライマーの組み合わせでPCRを行なった。反応は、100 μ lの反応液中にプライマーを各20 μ M、*Anabaena*

*variabilis*のゲノムDNAを1 μ g入れ、GeneAmp PCR Kit (宝酒造) を用いて行なった。反応の温度制御は、95°C (1分)、45°C (1分)、72°C (2分) を1サイクルとして35サイクル行なった。但し、1サイクル目の95°Cは3分間とした。反応終了後、反応液10 μ lを2%アガロースゲルで電気泳動して合成されたDNAを分離し分析した。その結果、配列番号6と8に示された塩基配列を有するプライマーの組み合わせで合成されたDNA中に、予想される大きさ (約190bp) のDNA断片が主要なバンドとして検出された。このDNA (以下、des 9 var という) 断片の両末端をKlenowフラグメントで平滑化した後、プラスミドpTZ18R (Pharmacia)のSma I 部位にクローニングし、蛍光DNAシーケンサー (Applied Biosystems) を用いて塩基配列を決定した。得られた塩基配列を配列番号1に示す。この塩基配列から推定されるアミノ酸配列 (配列番号2) は、マウスのステアロイル-CoA不飽和化酵素と有意な相同性を示した [第1図: des 9 var 断片がコードするアミノ酸配列とマウスのステアロイル-CoA不飽和化酵素 (MSCD2) のアミノ酸配列の比較を示す]。

次に、des 9 var 断片をプローブとして、*Anacystis nidulans*のゲノムDNAをサザン分析した。制限酵素Xho I, Pst I およびBamH I の各々を単独で用いて約0.1 μ g の*Anacystis nidulans*のゲノムDNAを切断し、0.8%アガロースゲル電気泳動でDNA断片を分離後、ナイロンメンブレン (Hybond-N⁺; Amersham) にブロッティングした。プローブDNAはMultiprime DNA labelling Kit (Amersham) を用いて [α -³²P] dCTPで標識した。6 \times SSPE [1 \times SSPEは10mMリン酸緩衝液 (pH7.0), 1 mM EDTA, 0.15M NaCl], 0.2% SDSおよび100 μ g/mlニシン精子DNAから成る液中で55°C、16時間インキュベーションしてプローブDNAとメンブレンを反応させた。その後、メンブレンを2 \times SSC [1 \times SSCは0.15M NaCl, 15mMクエン酸ナトリウム] 中で室温、15分を2回、次いで0.1 \times SSC中で40°C、15分を2回振とうして洗い、オートラジオグラフィーを行なった。その結果、いずれの制限酵素で切断した場合も1本のDNA断片のみが検出された (第2図: 図中、NonはゲノムDNAを制限酵素で切断していないことを示す)。

〔実施例2〕 des 9 var 断片と相同性の高い*Anacystis nidulans*ゲノム中のDN

A鎖のクローニング

Anacystis nidulans R2-SPc (東京大学分子細胞生物学研究所より分譲) の培養およびゲノムDNAの調製は、*Anabaena variabilis* の場合と同様に行なった。約100 μ gのゲノムDNAをSau3AIで部分消化した後、Molecular Cloning 2nd edition, pp. 2.85-2.87(Sambrook, J. et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory, 1989) の方法に従って、ショ糖密度勾配下での超遠心分離により約9から23kbpのDNA断片を回収した。これをBamHIとHindIIIで切断したラムダファージベクター λ DASH II(Stratagene) にクローニングした後、ファージ粒子にパッケージングし*Anacystis nidulans*のゲノムDNAライブラリーを得た。このファージライブラリーを大腸菌P2392に感染させ、NZYM培地を入れた直径約15cmのシャーレにまいて総数約10万個のプラークを形成させた後、ナイロンメンブレン (Hybond-N⁺; Amersham) にブロッティングした。上記のサザン分析と同様に、 $[\alpha - ^{32}P]$ dCTPで標識したdes 9 var断片をこのメンブレンと反応させ、オートラジオグラフィーによって検出した陽性ファージを再度同様にスクリーニングすることにより、シグナル強度の異なる約30個のファージクローンを得た。この中から任意に12クローンを選び、常法に従ってファージDNAを得た。得られたファージDNAを数種類の制限酵素で切断し、0.8%アガロースゲル電気泳動で分離後、ナイロンメンブレンにブロッティングした。このメンブレンを上記のスクリーニングと同じ条件でサザン分析し、プローブDNAとハイブリダイズするDNA断片の長さとそのシグナル強度を比較した。その結果、 λ 5と λ 15の2クローンが最も強いシグナルを示し、またインサートDNA断片の長さもそれぞれ11および15kbpであったため目的のORF全体を含むのに十分と判断し、この2クロンのインサートDNAにつき更に幾つかの制限酵素で切断してサザン分析を行なった。その結果XhoIで切断しハイブリダイズすると、2クローンとも約5kbpのDNA断片が検出されたので、これをpBluescript SK-(Stratagene) のXhoIサイトにサブクローニングし、 λ 5と λ 15由来のDNA断片をそれぞれ含むプラスミドp5Xとp15Xを得た。p5Xとp15Xの詳細な制限酵素地図を作り比較したところ、ともに同一のゲノムDNA断片を含むと判断された〔第3図： λ 5、 λ 15およびp15XのインサートDNA断片の相互関係

を示す。網かけした長方形はスクリーニングの過程でプローブのdes 9 var 断片がハイブリダイズしたDNA断片を示す。太い矢印はdes 9 nid（後述）の領域とセンス鎖の方向を示す。細い矢印はdes 9 nidを含む領域のシーケンスの方向を示す。5, 1.25および0.5kbpの各バーは左の各図におけるサイズマーカーを示す。制限酵素の略号は、B, BamHI; H, HindIII; N, NotI; Hp, HpaI; RI, EcoRI; RV, EcoRV; S, SalI; P, PstI; X, XhoIを示す〕。

そこで、制限酵素あるいはExoIIIによるディリーションプラスミドをp15Xより作成し、des 9 var 断片がハイブリダイズする領域を含む約2 kbpのDNA断片の塩基配列を蛍光DNAシーケンサーを用いて決定した（第3図）。その結果そのDNA断片中には834bpからなるORF（des 9 nid）が存在し（配列番号3）、278残基のアミノ酸がコードされていると推定された（配列番号4）。先にクローニングした*Anabaena variabilis* 由来のdes 9 var 断片がコードしているアミノ酸配列（配列番号2）との相同性は約80%であった。さらに、核酸およびアミノ酸配列の解析ソフト（GENETYX；ソフトウェア開発）と核酸およびアミノ酸配列のデータベース（EMBLおよびDDBJ）を用いて相同性の高いアミノ酸配列の検索を行なったところ、マウスのステアロイル-CoA不飽和化酵素との相同性が全体では約30%であるが局所的に非常に高いこと〔第4図：des 9 nidとマウスのステアロイル-CoA不飽和化酵素（MSCD2）のアミノ酸配列の比較〕から、取得したdes 9 nidは脂肪酸を不飽和化する酵素をコードすることが強く示唆された。

〔実施例 3〕 des 9 nid遺伝子の大腸菌での発現による活性測定

Anacystis nidulansは不飽和化酵素として脂質に結合した飽和脂肪酸の 9 位を不飽和化する Δ 9 位不飽和化酵素活性しか持たない (Bishop, D. G. et al., Plant Cell Physiol., 27:1593, 1986) ため、des 9 nidがコードするポリペプチドを大腸菌で発現させ活性測定することを試みた。

p15Xから直接発現させることは困難なので、大腸菌での発現用のベクターを作成した。即ち、ベクターとしてpET3a(Novagen)用い、そのNdeIとBamHIの間に des 9 nidをアミノ末端に余計なアミノ酸を付けない用にしてクローニングすることを以下のようにして行なった。des 9 nidのコードするタンパクのC末端側直後にBamHIサイトを入れるために、C末端を缺む 2 箇所の塩基配列を使ってPCR反応を行なった。即ち、

センスプライマー ; 5' -ACGTCATGGCCTGCAGT (下線はPstIサイト) (配列番号 9)
アンチセンスプライマー ; 5' -CGCGGATCCTTAGTTGTTTGGAGACG (1 重線はBamHIサイト、2 重線はストップコドン) (配列番号 10)

p15Xを鋳型として上記の 2 つのプライマーを用いてPCR反応を行なうと約 140 bp の産物が得られ、これをpUC19のSmaI部位にサブクローニングして塩基配列に間違いのないことを確認した。この結果得られたプラスミドのBamHIの下流にはEcoRI部位が生じた。これをEcoRIとPstIで順に切断し、一方、p15Xも同じ制限酵素で切断することにより、ストップコドンの直後にBamHI部位を導入した。このプラスミドをSalIで切断した後、4 種のdNTP存在下でDNAポリメラーゼKlenow断片を用いてFill in反応を行ない、引き続きHindIIIで切断した。これに、以下の 2 種の合成DNAから成るアダプターを導入する事によりアミノ末端側にNdeI部位を導入した。即ち、

5' -CATATGACCCTTGCTATCCGACCCA (下線はNdeI) (配列番号 11) 及び
5' -AGCTTGGGTCGGATAGCAAGGGTCATATG (1 重線はNdeIサイト、2 重線はHindIIIの一部) (配列番号 12)

を等モル量混合しアダプターとした。以上のようにして出来たプラスミド (pDes9Nde) を、常法 (Molecular cloning pp.250-251; 1982) に従って調整した大腸菌株BL21(DE3) (Novagen)のコンピテントセルに導入し、アンピシリン耐性

による選別により形質転換株BLDES1を得た。

BLDES1及びpET3aのみを有するBL21株(BL1)を100mlのM9培地(200 μ g/mlのアンプシリン、4 mg/ml グルコース、10 μ M FeCl₃, 0.5 μ g/ml ビタミンB₁, 1 mg/ml カザミノ酸を含む)に接種し、37℃で培養した。培養液の濁度が、波長600nmで0.50.D.になるまで培養を続けた後、イソプロピルチオガラクトシド(IPTG)を最終濃度1 mMになるように加えた。更に1時間培養し、 $\Delta 9$ 位不飽和化酵素遺伝子の発現を誘導した。回収した大腸菌ペレットを1.2% NaClで洗った後、脂質を抽出した。脂質はBlighとDyerの方法(Can J. Biochem. Physiol., 37: 911, 1959)に従って抽出し、2.5 mlの5%塩酸メタノールで完全密封化して85℃2時間半反応させ脂肪酸をメチル化した。生じた脂肪酸メチルエステルを2.5 mlのヘキサンで4回抽出し、窒素ガスで溶媒を除去して濃縮した。脂肪酸メチルエステルの分析には、ガスクロマトグラフィーを用いた。脂肪酸の同定は標準脂肪酸メチルとの保持時間を比較して行なった。定量にはクロマトパックC-R7A plus(島津製作所)を用いた。結果を次の第1表に示す。

第1表. 大腸菌の脂肪酸組成

菌株名	16:0	16:1	18:1(11)	その他
BL1(0時間)	47	20	29	4
BL1(1時間)	50	17	29	4
BLDES1(0時間)	44	22	30	4
BLDES1(1時間)	40	28	28	4

ここで時間はIPTGによるタンパクの誘導時間を示す。

BLDES1では16:1が増加していることが明らかである。即ち、本遺伝子は16:0への不飽和化活性を有することが示された。

また、これらの菌株を0.1 mMのステアリン酸を含むM9培地で培養し、同様に比較したところ、BL1株に比べBLDES1では16:1のみならず、18:1(9)も生成し、des 9 nid がコードするポリペプチドは16:0ばかりでなく18:0も基質として不飽和脂肪酸を作出することが示された。

〔実施例 4〕 des 9 nid遺伝子のタバコ植物体への導入

Anacystis nidulans由来のdes 9 nid遺伝子を次のようにしてタバコに組み込んだ。

(1) 植物発現用ベクタープラスミドの構築

pDes9NdeをSacIとSalIで切断する事により両酵素の切断部位で挟まれたdes 9 nid遺伝子断片が得られる。一方、エンドウのRuBisCO遺伝子を含むクローンpSNIP9 (Schreicherら、EMBO J. 4, 25(1985)) から葉緑体へのtransit配列をHindIIIとSphIで切り出し、それと同一の制限酵素で切断したpUC118にクローニングすることにより、transit配列の下流にマルチクローニングサイトを有するプラスミド (pTRA3) を得た。このHindIIIサイトを切断後Klenow酵素でFill inしXbaIリンカーをいれた (pTRA3X)。このプラスミドpTRA3XをSal IとSac Iで切断し、さきに同一の制限酵素で切断する事によって得たdes 9 nid遺伝子断片を挿入した (pTRA3Xdes9)。このプラスミドではRuBisCOのtransit配列に引き続き、それと同一の読み枠でdes 9 nid遺伝子が翻訳される。これをSac IとXba Iで切断して次に述べる植物用のベクターに挿入する。植物発現型バイナリープラスミドpBI121(Clontech)を制限酵素SacIとXbaIで切断して得たプラスミドpBI(-GUS)は β -Glucuronidase遺伝子 (GUS遺伝子) を含んでおらず、これにカリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーターとノパリン合成酵素 (NOS) ターミネーターの間に前述した導入遺伝子を挿入することにより、植物への導入用ベクター (pBI121(-GUS)Rbsc-des9) を得た。

(2) pBI121(-GUS)Rbsc-des9のアグロバクテリウムへの導入

Agrobacterium tumefaciens LBA4404 (Clontech)を50mlのYEB培地 (1 l当たりビーフエキス 5 g、酵母エキス 1 g、ペプトン 1 g、ショ糖 5 g、2mM MgSO₄(pH7.4)) に接種し、28°Cで24時間培養後、培養液を3,000rpm、4°C、20分の遠心で集菌した。菌体を 10mlの 1 mM Hepes-KOH(pH7.4)で3回洗った後、3 mlの10%グリセロールで1回洗い、最終的に 3 mlの10%グリセロールに懸濁してDNA導入用アグロバクテリウムとした。

このようにして得た菌液50 μ l及び前記のプラスミドpBI121(-GUS)Rbsc-des9 1 μ gをキューベットに入れ、エレクトロポレーション装置 (Gene Pulser;

BioRad) を用いて 25 μ F、2500V、200 Ω の条件で電気パルスをかけ、プラスミドDNAをアグロバクテリウムに導入した。この菌液をエッペンドルフチューブに移し、800 μ l の SOC 培地 (1 l 当たりトリプトン 20 g、酵母エキス 5 g、NaCl 0.5 g、2.5 mM KCl、10 mM MgSO₄, 10 mM MgCl₂, 20 mM グルコース、pH7.0) を加え、28°C で 1.5 時間静置培養した。この培養液 50 μ l を、100 ppm のカナマイシンを含む YEB 寒天培地 (寒天 1.2%) 上にまき、28°C で 2 日間培養した。

得られたコロニー群からシングルコロニーを選び、このコロニーからアルカリ法でプラスミドDNAを調整した。このプラスミドDNAを適当な制限酵素で消化後、1%アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、³²Pでラベルしたdes9nid遺伝子断片をプローブとしたサザン分析により、プラスミドpBI121(-GUS)Rbsc-des9を含んでいることを確認した。このAgrobacterium tumefaciensをALBBSDESと呼ぶ。

(3) タバコの形質転換

上記の菌株ALBBSDESを、50ppmのカナマイシンを含むLB液体培地で28°C、2時間振とう培養した。培養液1.5 mlを10,000rpm、3分間遠心して集菌後、カナマイシンを除くために1 mlのLB培地で洗浄した。更に10,000rpm、3分間遠心して集菌後、1.5 mlのLB培地に再懸濁し感染用菌液とした。

タバコへの感染に当たっては、若い葉を採取し、0.5%次亜塩素酸ナトリウム水溶液に10分間浸せき後、滅菌水で3回洗い、滅菌済みの濾紙上で水を拭って感染用の葉とした。この葉を1片が1 cm² になるようにメスで無菌的に切断し、上記のアグロバクテリウムの菌液上に葉の裏を上にして置き、2分間静かに振とうした後、滅菌済みの濾紙上に葉を置いて過剰のアグロバクテリウムを除いた。シャーレ内のMS-B5培地 (ベンジルアデニン1.0 ppm、ナフタレン酢酸 0.1 ppm、及び寒天 0.8 %を含む) (Murashige, T. and Skoog, F. Plant Physiol., 15: 473, (1962)) 上に、ワットマン No. 1濾紙 (φ 7.0 cm) を置き、この濾紙に裏を上にして葉を置いた。シャーレをパラフィルムでシールし、16時間明、8時間暗の周期で25°C、2日間培養した。ついでクラフォラン 250 ppmを含むMS-B5培地上に移し、同様に10日間培養してアグロバクテリウムを除去した。

更にクラフォラン 250 ppm及びカナマイシン 100 ppmを含む MS-B5培地上に置床し、同様に7日間培養した。この間に葉片の周囲がカルス化し、シュート原基が生じた。更に10日間培養後、伸張したシュートをクラフォラン 250 ppm及びカナマイシン 100 ppmを含む MS-HF培地（ベンジルアデニン及びナフタレン酢酸を含まない MS-B5培地）に置床した。10日間培養後、発根したシュートをカナマイシン耐性の形質転換体とし、プラントボックス内のクラフォラン 250 ppmを含む MS-HF培地に移植した。

〔実施例5〕形質転換タバコのゲノムサザン及びノーザン分析

目的遺伝子の導入を確認するため、カナマイシン耐性のタバコからDNAを抽出し、サザン及びノーザン分析を行った。ゲノムDNAの抽出法はCTAB法で成書（Rogers, S. O. & Bendich, A. J.; Plant Molecular Biology Manual A6; 1(1988)）に従って行なった。即ち、2gのタバコの葉を液体窒素内で粉碎し、CTAB抽出緩衝液でゲノムDNAを得た。10 μ gのDNAを制限酵素EcoRIとXbaIで切断後0.7%アガロースゲルで電気泳動し、その後ナイロン膜（Hybond N+; Amersham）に0.4 N NaOHで転写した。この膜にpTRA3Xdes9からtransit付きの不飽和化酵素遺伝子をプローブとして、65℃で16時間ハイブリダイゼーションすることにより目的遺伝子がタバコゲノムに組み込まれていることを確認した。

また、導入遺伝子の発現を調べるために、タバコの葉約2gからRNAの分析を行なった。方法はグアニジウムチオシアン酸による抽出を行ない（Nagy, F.ら: Plant Molecular Biology Manual B4; 1(1988)）、poly(A)+RNAをホルムアルデヒド入りのアガロースゲルで電気泳動後、ナイロン膜（Hybond N; Amersham）に転写し、サザン法と同様のハイブリダイゼーションにより分析した。様々の量のRNAを発現している個体があったが、その中から発現量の多い個体について脂質分析を行なった。

〔実施例6〕形質転換タバコの脂質の脂肪酸分析

実施例5でRNAの高発現が確認されたタバコ形質転換体、及び対照としてpBI121で形質転換したタバコの葉から、以下の方法によりホスファチジルグリセロール（PG）、スルフォキノボシルジアシルグリセロール（SQDG）等の脂

質を調整し、その脂肪酸組成を分析した。なお、一部の個体からは根の脂質も分析した。

(1) 全脂質の抽出

脂質の抽出はBligh-Dyer法 (Can J. Biochem. Physiol., 37: 911, 1959) で行なった。湿重量 2 g の葉 (一部の根を試料とするときは 1 g) をメスで細断し、これに 20 ml のクロロホルム : メタノール (1 : 2、体積比) を加え、ホモジナイザーで葉を破碎後、15 分間静置した。これにクロロホルム 12ml 及び蒸留水 12ml を加え激しく混合した後、3000rpm、4℃、30 分間の遠心で水層と有機層の 2 層に分け、有機層 (下層) を回収した。これに適当量のエタノールを加えて、ロータリーエバポレーターを用い、30℃減圧下で溶媒を除いた。これを 2 ml のクロロホルム : メタノール (1 : 4、体積比) に溶かし、全脂質抽出物とした。この一部を 5 % メタノール性塩酸を用いて後述の方法により処理することで、メチル化脂肪酸を得た。

(2) 脂質の分画

DEAE-Toyopearl 650C (東ソー) の懸濁液 2.5ml を 1 M 酢酸ナトリウム水溶液 (pH7.0) 25 ml と混ぜ酢酸型とした。これを、蒸留水、メタノールで順次洗浄し、最後にメタノールに懸濁して、内径 2 cm のカラムに高さ 1.5cm まで詰め、更に 50 ml のクロロホルム : メタノール (1 : 4、体積比) で洗浄した。

次に、全脂質抽出物をカラムにかけ、50 ml のクロロホルム : メタノール (1 : 4、体積比) でモノガラクトシルジアシルグリセロール (MG DG)、ジガラクトシルジアシルグリセロール (DG DG)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルコリン (PC) を溶出して、中性脂質 (MG DG、DG DG、PE、PC) 画分とした。次に 5 ml の酢酸でホスファチジルセリン (PS) を溶出して除き、20ml のクロロホルム : メタノール (1 : 4、体積比) で酢酸を洗浄した後、50 ml のクロロホルム : メタノール : 10 M 酢酸アンモニウム水溶液 (20:80:0.2、体積比) で PG、SQ DG、ホスファチジルイノシトール (PI) を含む画分を得た。この画分に 15ml のエタノールを加え、減圧下で溶媒を除いた。これを 0.2ml のクロロホルム : メタノール (2 : 1、体積比) に溶かし、酸性脂質 (PG、SQ DG、PI) 画分とした。

MGDG、DGDG、PE、PC画分は、ケイ酸カラムクロマトグラフィー（イアトロビーズ、ヤترون社）により、さらに分画した。即ち、クロロホルム 1 mlに溶かした試料をクロロホルムで平衡化したカラムにかけ、クロロホルム：アセトン（4：1）、アセトン、メタノールで順に溶出すると、糖脂質（MGDG、DGDG）はアセトンで、リン脂質（PC、PE）はメタノールで溶出された。

（３）薄層クロマトグラフィー（TLC）によるPGの単離精製と脂肪酸分析

（２）で得た画分をシリカゲル-TLCプレート#5721（Merck）で分離した。展開溶媒としては、酸性脂質の場合はクロロホルム：アセトン：メタノール：酢酸：水（50:20:10:15:5、体積比）を、中性脂質の場合はクロロホルム：メタノール：水（70:21:3、体積比）を用いた。TLCで分離後、プリムリン（80%アセトン溶液）を噴霧して紫外線光下で蛍光発色させ、標準となる脂質と移動度を比較することにより各クラスの脂質の画分を推定し、発色した脂質をシリカゲルごとに取り取りネジ栓付試験管に入れた。この脂肪酸組成を推定する場合には、この試験管に3 mlのメタノール性5%塩酸を加え、完全密封下85℃で2時間半反応させ、脂肪酸メチル化した。一方、sn-1、2ごとの脂肪酸組成を決めるために、削り取ったシリカゲルから5 mlのクロロホルム：メタノール（2：1）混液で脂質を回収し、乾固した後、1 mlの50 mM TrisCl（pH 7.2）及び0.05 % Triton X-100を加え、激しく攪拌して脂質を分散させて、クモノスカビ（*Rhizopus delemar*）由来のリパーゼ（2500 U；ベーリンガー社）を加え37℃で30分間保温することにより選択的にsn-1位の脂肪酸を分解させた。この反応産物を濃縮後、TLC（クロロホルム：アセトン：メタノール：酢酸：水＝10：4：2：3：1）により未反応の脂質、リゾ体、及び脂肪酸に分離した。これらもゲルから回収し前述のようにメタノール性塩酸でメチル化脂肪酸を得た。生じた脂肪酸メチルエステルを3 mlのヘキサンで4回抽出し、減圧下で溶媒を除去して濃縮した。脂肪酸メチルの分析には、ガスクロマトグラフィーを用いた。脂肪酸の同定は標準脂肪酸メチルとの保持時間を比較して行なった。定量にはクロマトパックC-R7A plus（島津製作所）を用いた。全脂質の結果を第2表、PGについて第3表、その他の代表的な脂質ごとの分析結果を第4表に示す。表は、対

照植物体については2個体、形質転換体については独立した2又は3個体の分析値の平均値を示している。

第2表. 葉の全脂質の脂肪酸分析結果

植物	16:0	16:1	16:2	16:3	18:0	18:1	18:2	18:3	Σ 16:0+18:0
対照植物体	17	3	1	4	3	1	9	63	20
形質転換体	10	12	1	5	1	2	14	56	11

第3表. PGの脂肪酸分析結果

植物	16:0	16:1t	16:1c	18:0	18:1	18:2	18:3	Σ 16:0+18:0+16:1t
PG 対照植物体	32	37	0	1	5	10	14	70
形質転換体	18	37	8	0	10	12	15	55

第4表. その他の脂質の脂肪酸分析結果

	植物	16:0	16:1	16:2	16:3	18:0	18:1	18:2	18:3	$\Sigma 16:0+18:0$
SQDG	対照植物体	51	1	0	0	3	2	7	36	54
	形質転換体	36	22	0	0	0	4	9	28	36
MGDG	対照植物体	7	0	1	9	1	2	4	76	8
	形質転換体	3	9	1	10	0	1	5	69	3
DGDG	対照植物体	19	0	0	0	3	1	4	73	22
	形質転換体	9	13	0	1	0	1	5	70	9
PC	対照植物体	28	0	0	0	5	1	21	44	33
	形質転換体	19	12	0	0	3	4	40	23	22
PE	対照植物体	20	0	0	0	3	1	6	70	23
	形質転換体	18	10	0	0	2	2	31	38	20
PI	対照植物体	48	1	0	0	2	1	11	37	50
	形質転換体	44	7	0	0	1	2	18	28	45

PGに結合した脂肪酸分析の結果から、*Anacystis nidulans*由来の脂肪酸不飽和化酵素を発現している形質転換タバコでは16:0 (パルミチン酸)が大幅に減り、そのかわりに16:1 *cis*が増えている事、また、少量在った18:0もほとんど無くなり、逆に18:1が増えていることが判明した。その結果、飽和脂肪酸(16:0+16:1 *trans*+18:0 (ステアリン酸))含量は、対照のタバコでは70%であるのに対し、不飽和化酵素の遺伝子を形質転換したタバコでは55%と著しく低くなっている。PGのsn-1、2位別の分析結果から、sn-2は98%以上飽和脂肪酸(16:0又は16:1 *trans*)で占められており、新たに遺伝子導入により生成した16:1はすべてsn-1にあることが判明した。従って、この不飽和化酵素遺伝子を形質転換したタバコのPGのsn-1位の飽和脂肪酸は極めて少なくなっていることが明らかである。従って、sn-1、2両位共に、飽和脂肪酸から成る、所謂、飽和分子種の量も大幅に減少し、脂質の分子種の組成上著しく低温に耐性な型に変化した事がわかる。

一方、その他の脂質のMGDG、DGDG、SQDG、PC、PE、PIでも、16:0の減少と、それに呼応した16:1の10%前後の増加が明らかであり、また、18:0の不飽和化も進んでいた。このうち、MGDGとDGDGについては16:1の生成は主としてsn-1位にあったが、sn-2位からも少量検出された。MGDG、DGDG、SQDG及びPGは主に葉緑体に存在する脂質であり、ラン藻である*Anacystis nidulans*の不飽和化酵素を高等植物の葉緑体で発現させることにより驚くほど不飽和化が進展したことがわかる。それにも増して、これらの4種の脂質は*Anacystis nidulans*の膜にも存在する物であり、不飽和化の基質になる可能性は高かったが、それ以外のPC、PE及びPIは*Anacystis nidulans*の膜には存在しない脂質であり、しかも高等植物では主に葉緑体外に存在する脂質であることから、それらにおいてもパルミチン酸、及びステアリン酸が不飽和化されたのは驚くべきことである。

このように、形質転換タバコの脂質分析の結果から、*Anacystis nidulans*由来の脂肪酸不飽和化酵素が、高等植物であるタバコの形質転換体において、ほとんど総ての脂質の16:0と18:0を極めて効率良く不飽和化できることを本実施例は証明した。

また、根の全脂質について、脂肪酸分析をした結果を第5表に示す。

第5表. 根の全脂質の脂肪酸分析

植物	16:0	16:1	16:2	16:3	18:0	18:1	18:2	18:3	Σ 16:0+18:0
非形質転換体	26	0	0	0	5	2	47	21	31
形質転換体	17	13	0	0	2	4	58	6	19

この結果から、*Anacystis nidulans*由来の脂肪酸不飽和化酵素は、驚くべきことに、葉のみならず根においても16:0と18:0の不飽和化を触媒したこと

がわかる。このことは、本発明の脂肪酸不飽和化酵素遺伝子が植物の低温耐性を変化させる可能性ばかりでなく、不飽和脂肪酸含量を増やす可能性を有し、植物を油の原料とする産業においても有用であることを示す。

〔実施例 7〕 形質転換タバコの低温耐性試験

上記の RNA の発現解析及び脂質分析で有望と思われた個体については、自殖することにより次世代の種子を採取した。その一部をカナマイシン 800 ppm を含む MS-HF 培地に蒔き、25℃、16 時間明、8 時間暗の日長で 2 週間栽培後にカナマイシン耐性の実生を選抜した。この実生をプラントボックスに移植して、更に 4 週間栽培した。また、コントロールとして、pBI121 により形質転換した個体についても、上記の操作を行った。

次に、4℃連続光のもとで 11 日間低温処理した後、25℃で 2 日間栽培した。その結果、コントロール植物（pBI121 により形質転換した植物）では葉に対して大幅な萎縮症状及びクロロシスが観察されたのに対し、形質転換植物ではほとんど傷害は観察されなかった。従って、不飽和化酵素遺伝子の導入により低温耐性が向上したと推定された。

産業上の利用可能性

本発明の $\Delta 9$ 位不飽和化酵素をコードする遺伝子を植物に導入することにより、植物に低温耐性を付与することおよび植物中の不飽和脂肪酸含量を増やすことが可能となった。

【配列表】

配列番号 : 1

配列の長さ : 196

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

起源

生物名 : *Anabaena variabilis*

株名 : IAM M-3

配列 :

GCT CTG GGG TTG TTG CTG TTA TAT CTA GGC GGG TGG TCT TTT GTG GTC TGG
GGA GTT TTC TTT CGC ATC GTT TGG GTT TAC CAC TGT ACT TGG TTG GTA AAC
AGC GCT ACC CAT AAG TTT GGC TAC CGC ACC TAT GAT GCT GGT GAC AGA TCC
ACT AAC TGT TGG TGG GTA GCT GTC CTA GTG TTT GGT GAA GGT T

配列番号 : 2

配列の長さ : 65

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

起源

生物名 : *Anabaena variabilis*

株名 : IAM M-3

配列 :

Ala Leu Gly Leu Leu Leu Leu Tyr Leu Gly Gly Trp Ser Phe Val Val Trp
Gly Val Phe Phe Arg Ile Val Trp Val Tyr His Cys Thr Trp Leu Val Asn Ser
Ala Thr His Lys Phe Gly Tyr Arg Thr Tyr Asp Ala Gly Asp Arg Ser Thr Asn
Cys Trp Trp Val Ala Val Leu Val Phe Gly Glu Gly

配列番号 : 3

配列の長さ : 8 3 7

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

起源

生物名 : *Anacystis nidulans*

株名 : R2-SPc

配列 :

ATG ACC CTT GCT ATC CGA CCC AAG CTT GCC TTC AAC TGG CCG ACC GCC CTG
TTC ATG GTC GCC ATT CAC ATT GGA GCA CTG TTA GCG TTC CTG CCG GCC AAC
TTT AAC TGG CCC GCT GTG GGC GTG ATG GTT GCG CTG TAT TAC ATT ACC GGT
TGT TTT GGC ATC ACC CTA GGC TGG CAC CGG CTA ATT TCG CAC CGT AGC TTT
GAA GTT CCC AAA TGG CTG GAA TAC GTG CTG GTG TTC TGT GGC ACC TTG GCC
ATG CAG CAC GGC CCG ATC GAA TGG ATC GGT CTG CAC CGC CAC CAT CAC CTC
CAC TCT GAC CAA GAT GTC GAT CAC CAC GAC TCC AAC AAG GGT TTC CTC TGG
AGT CAC TTC CTG TGG ATG ATC TAC GAA ATT CCG GCC CGT ACG GAA GTA GAC
AAG TTC ACG CGC GAT ATC GCT GGC GAC CCT GTC TAT CGC TTC TTT AAC AAA
TAT TTC TTC GGT GTC CAA GTC CTA CTG GGG GTA CTT TTG TAC GCC TGG GGC
GAG GCT TGG GTT GGC AAT GGC TGG TCT TTC GTC GTT TGG GGG ATC TTC GCC
CGC TTG GTG GTG GTC TAC CAC GTC ACT TGG CTG GTG AAC AGT GCT ACC CAC
AAG TTT GGC TAC CGC TCC CAT GAG TCT GGC GAC CAG TCC ACC AAC TGC TGG
TGG GTT GCC CTT CTG GCC TTT GGT GAA GGC TGG CAC AAC AAC CAC CAC GCC
TAC CAG TAC TCG GCA CGT CAT GGC CTG CAG TGG TGG GAA TTT GAC TTG ACT
TGG TTG ATC ATC TGC GGC CTG AAG AAG GTG GGT CTG GCT CGC AAG ATC AAA
GTG GCG TCT CCA AAC AAC TAA

配列番号 : 4

配列の長さ : 278

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

起源

生物名 : *Anacystis nidulans*

株名 : R2-SPc

配列 :

Met Thr Leu Ala Ile Arg Pro Lys Leu Ala Phe Asn Trp Pro Thr Ala Leu Phe
Met Val Ala Ile His Ile Gly Ala Leu Leu Ala Phe Leu Pro Ala Asn Phe Asn
Trp Pro Ala Val Gly Val Met Val Ala Leu Tyr Tyr Ile Thr Gly Cys Phe Gly
Ile Thr Leu Gly Trp His Arg Leu Ile Ser His Arg Ser Phe Glu Val Pro Lys
Trp Leu Glu Tyr Val Leu Val Phe Cys Gly Thr Leu Ala Met Gln His Gly Pro
Ile Glu Trp Ile Gly Leu His Arg His His His Leu His Ser Asp Gln Asp Val
Asp His His Asp Ser Asn Lys Gly Phe Leu Trp Ser His Phe Leu Trp Met Ile
Tyr Glu Ile Pro Ala Arg Thr Glu Val Asp Lys Phe Thr Arg Asp Ile Ala Gly
Asp Pro Val Tyr Arg Phe Phe Asn Lys Tyr Phe Phe Gly Val Gln Val Leu Leu
Gly Val Leu Leu Tyr Ala Trp Gly Glu Ala Trp Val Gly Asn Gly Trp Ser Phe
Val Val Trp Gly Ile Phe Ala Arg Leu Val Val Val Tyr His Val Thr Trp Leu
Val Asn Ser Ala Thr His Lys Phe Gly Tyr Arg Ser His Glu Ser Gly Asp Gln
Ser Thr Asn Cys Trp Trp Val Ala Leu Leu Ala Phe Gly Glu Gly Trp His Asn
Asn His His Ala Tyr Gln Tyr Ser Ala Arg His Gly Leu Gln Trp Trp Glu Phe
Asp Leu Thr Trp Leu Ile Ile Cys Gly Leu Lys Lys Val Gly Leu Ala Arg Lys
Ile Lys Val Ala Ser Pro Asn Asn

配列番号 : 5

配列の長さ : 18

配列の型 : 核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

ATGACAATTG CTAATTCA

配列番号：6

配列の長さ：15

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

GCTCTGGGGT TGTTG

配列番号：7

配列の長さ：15

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CAACAACCCC AGAGC

配列番号：8

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

RTGRTGRTTR TTRTGCCA

配列番号：9

配列の長さ：17

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

ACGTCATGGC CTGCAGT

配列番号：10

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CGCGGATCCT TAGTTGTTTG GAGACG

配列番号：11

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CATATGACCC TTGCTATCCG ACCCA

配列番号：1 2

配列の長さ：2 9

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

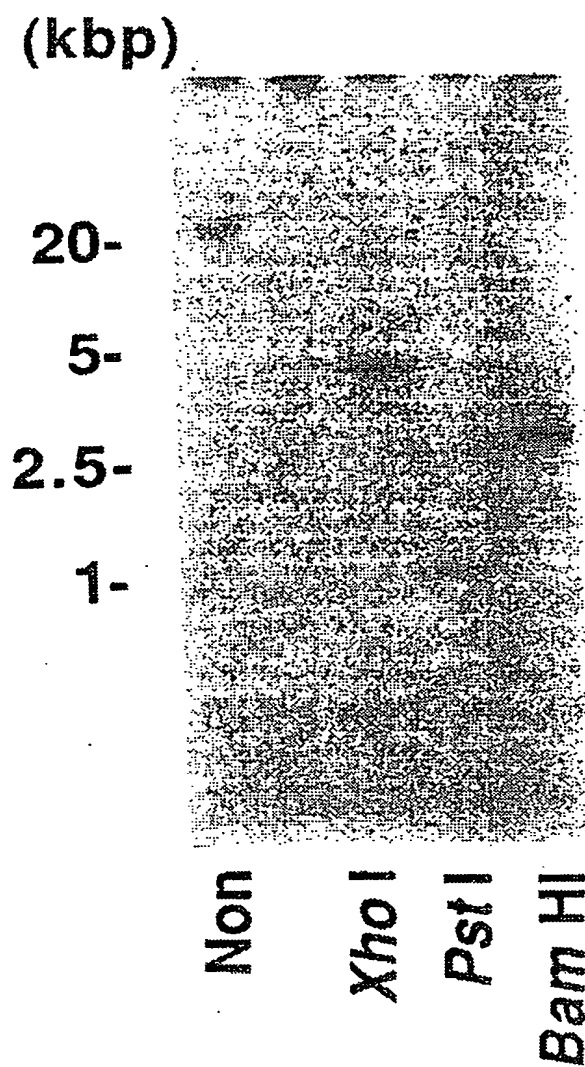
配列：

AGCTTGGGTC GGATAGCAAG GGTCATATG

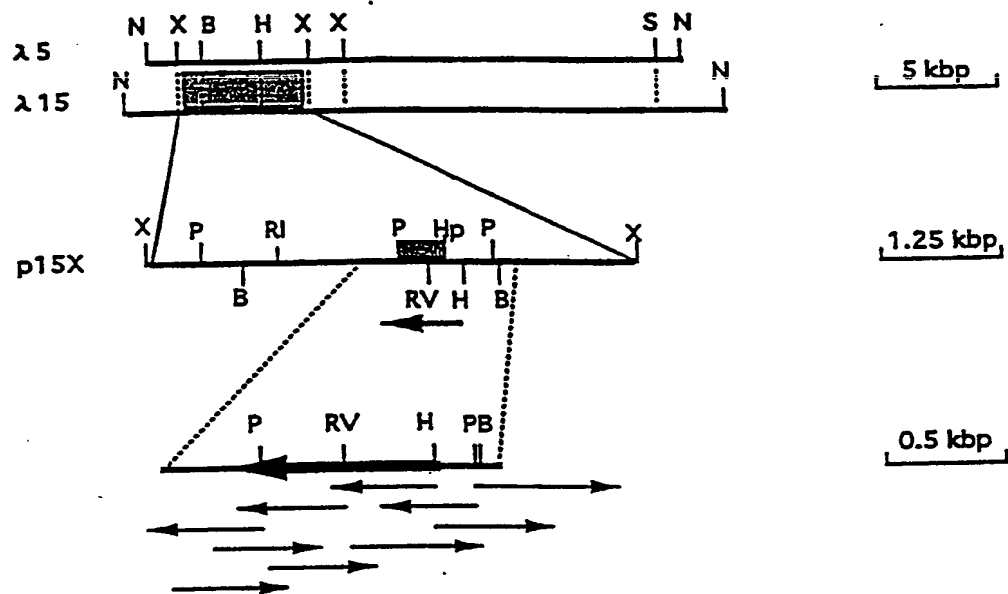
請 求 の 範 囲

1. 脂質に結合した脂肪酸の $\Delta 9$ 位を不飽和化する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子。
2. 脂質に結合した脂肪酸の $\Delta 9$ 位を不飽和化する活性を有するタンパク質が実質的に配列番号4に記載されたアミノ酸配列を有するものである請求の範囲第1項記載の遺伝子又は当該遺伝子の一部を含むポリヌクレオチド。
3. 脂質に結合した脂肪酸の $\Delta 9$ 位を不飽和化する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子が配列番号3に記載の塩基配列を含むDNA鎖である請求の範囲第1項記載の遺伝子又は当該遺伝子の一部を含むポリヌクレオチド。
4. 請求の範囲第1項乃至第3項のいずれかの項記載の遺伝子又は当該遺伝子の一部を含むポリヌクレオチドを含むベクター。
5. 請求の範囲第1項乃至第3項のいずれかの項記載の遺伝子又は当該遺伝子の一部を含むポリヌクレオチドが導入された植物細胞。
6. 請求の範囲第5項記載の植物細胞を分化させて植物体を再生させることを特徴とする植物の作出方法。
7. 請求の範囲第1項乃至第3項のいずれかの項記載の遺伝子又は当該遺伝子の一部を含むポリヌクレオチドが導入された植物。

第2図



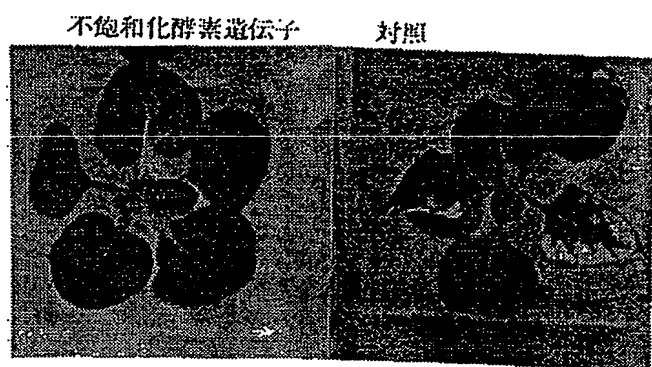
第3図



第4図

[illegible]

第5図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP94/02288

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12N15/00, C12N5/00, A01H1/00, A01H5/00//C12N9/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12N15/00, C12N5/00, A01H1/00, A01H5/00//C12N9/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
$\frac{P, X}{P, Y}$	Journal of Biological Chemistry, Vol. 269, No. 41 (1994) T. Sakamoto, et al. "Delta, 9 Acyl-lipid desaturases of cyanobacteria. Molecular cloning and substrate specificities in terms of fatty acids, sn-positions, and polar head groups" p. 25576-25580	$\frac{1, 4}{5-7}$
$\frac{X}{Y}$	EP, A, 561569 (Lubrizol Corp.), September 22, 1993 (22. 09. 93) & AU, A, 9335167 & CA, A, 2092661 & JP, A, 6014667	$\frac{1, 4-7}{5-7}$
$\frac{X}{Y}$	NL, A, 9002130 (Stichting Tech Wetenschappen), April 16, 1992 (16. 04. 92)	$\frac{1, 4-7}{5-7}$
$\frac{X}{Y}$	Journal of Biological Chemistry, Vol. 265, No. 33 (1990) J. E. Stukey, et al "The OLEI gene of Saccharomyces cerevisiae encodes the delta-9 fatty acid desaturase and can be functionally replaced by the rat stearylcoA desaturase gene" p. 20144-20149	$\frac{1, 4}{5-7}$

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

March 14, 1995 (14. 03. 95)

Date of mailing of the international search report

April 4, 1995 (04. 04. 95)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int. Cl.⁸ C12N15/00, C12N5/00, A01H1/00, A01H5/00 // C12N9/00</p>								
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int. Cl.⁸ C12N15/00, C12N5/00, A01H1/00, A01H5/00 // C12N9/00</p> <p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p>								
<p>国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)</p> <p>CAS ONLINE, WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS</p>								
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求の範囲の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>P, X P, Y</td> <td>Journal of Biological chemistry. 第269巻, 第41号 (1994) T. Sakamoto, et al. [Delta, 9 Acyl-lipid desaturases of cyanobacteria. Molecular cloning and substrate specificities in terms of fatty acids, sn-positions, and polar head groups] p. 25576-25580</td> <td>1, 4 5-7</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	P, X P, Y	Journal of Biological chemistry. 第269巻, 第41号 (1994) T. Sakamoto, et al. [Delta, 9 Acyl-lipid desaturases of cyanobacteria. Molecular cloning and substrate specificities in terms of fatty acids, sn-positions, and polar head groups] p. 25576-25580	1, 4 5-7
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号						
P, X P, Y	Journal of Biological chemistry. 第269巻, 第41号 (1994) T. Sakamoto, et al. [Delta, 9 Acyl-lipid desaturases of cyanobacteria. Molecular cloning and substrate specificities in terms of fatty acids, sn-positions, and polar head groups] p. 25576-25580	1, 4 5-7						
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>								
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの</p> <p>「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</p> <p>「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&」 同一パテントファミリー文献</p>								
<p>国際調査を完了した日</p> <p>14. 03. 95</p>		<p>国際調査報告の発送日</p> <p>04. 04. 95</p>						
<p>名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁 (ISA/JP)</p> <p>郵便番号100</p> <p>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>		<p>特許庁審査官 (権限のある職員)</p> <p>植 野 浩 志</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3449</p>						

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> Y	EP, A, 561569 (Lubrizol Corp.), 22. 9月. 1993 (22. 09. 93) &AU, A, 9335167 & CA, A, 2092661 &JP, A, 6014667	<u>1. 4-7</u> 5-7
<u>X</u> Y	NL, A, 9002130 (Stichting Tech Wetenschappen), 16. 4月. 1992 (16. 04. 92)	<u>1. 4-7</u> 5-7
<u>X</u> Y	Journal of Biological Chemistry, 第265巻, 第33号 (1990) J. E. Stukey, et al 「The OLEI gene of Saccharomyces cerevisiae encodes the delta-9 fatty acid desaturase and can be functionally replaced by the rat stearylcoA desaturase gene」 p. 20144-20149	<u>1. 4</u> 5-7

This Page Blank (uspto)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

This Page Blank (uspto)